

PCT/JP03/00668

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

24.01.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 1月25日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-017272

[ ST.10/C ]:

[ JP2002-017272 ]

出 願 人

Applicant(s):

オリンパス光学工業株式会社

REC'D 21 MAR 2003

WIPO PCT

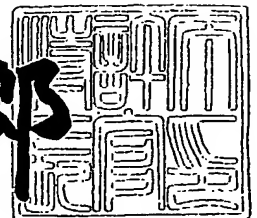
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月 4日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3012563

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 01P02548

【提出日】 平成14年 1月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68  
C12N 15/00  
A61B 19/00

【発明の名称】 核酸情報の検出方法及び装置

【請求項の数】 20

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学  
工業株式会社内

【氏名】 小池 尚

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学  
工業株式会社内

【氏名】 米川 裕之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学  
工業株式会社内

【氏名】 佐藤 卓朋

【特許出願人】

【識別番号】 000000376

【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100106909

【弁理士】

【氏名又は名称】 棚井 澄雄

【代理人】

【識別番号】 100064908

【弁理士】

【氏名又は名称】 志賀 正武

【選任した代理人】

【識別番号】 100101465

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 正和

【選任した代理人】

【識別番号】 100094400

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴木 三義

【選任した代理人】

【識別番号】 100086379

【弁理士】

【氏名又は名称】 高柴 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100118913

【弁理士】

【氏名又は名称】 上田 邦生

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008707

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書  
【発明の名称】 核酸情報の検出方法及び装置  
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標的核酸と、当該標的核酸配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するプローブとを接触させ、当該標的核酸と当該プローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの量に依存した量で発せられるシグナルを測定することにより、当該標的核酸の情報を検出する方法において、

当該シグナルのデータ取得をカイネティックに行うことを含む、核酸情報の検出方法。

【請求項 2】 前記のシグナルのデータ取得が、反応の測定条件または検出条件を変更しながら行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記のシグナルのデータ取得が、反応温度、又は反応溶液の組成、容量、若しくは種類のうちの少なくとも 1 つを変更しながら行われる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記の変更が、反応温度についての変更である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 標的核酸の配列の少なくとも一部に対して完全に相補的な完全マッチプローブ、及び当該完全マッチプローブの少なくとも一部が変異した 1 以上の種類の不完全マッチプローブを、当該標的核酸と接触させ、当該標的核酸と当該完全マッチプローブ又は当該不完全マッチプローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの結合強度の違いに基づいて当該標的核酸の核酸情報を検出する方法において、

当該ハイブリッドが発するシグナルを測定または検出する条件を連続的または段階的に変更しながら、当該シグナルのデータ取得をカイネティックに行うことを含む、核酸の核酸情報を検出する方法。

【請求項 6】 前記のシグナルのデータ取得が、反応温度、又は反応溶液の組成、容量、若しくは種類のうちの少なくとも 1 つを変更しながら行われる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 前記の変更が、反応温度についての変更である、請求項 6 に

記載の方法。

【請求項 8】 前記の反応温度についての変更が、検出するハイブリッドの  $T_m$  値未満の温度から、 $T_m$  値を越える温度間の温度上昇である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 前記の反応温度についての変更が、検出するハイブリッドの  $T_m$  値未満の温度から、 $T_m$  値を越える温度間の温度上昇及び温度下降からなる 1 回または複数回の温度サイクルである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】 前記の温度上昇の間にシグナル強度の極大値を測定することを含む、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】 前記の温度上昇の間にシグナル強度の変化量を測定することを含む、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 12】 前記のハイブリッドが発するシグナルを測定する温度を連続的又は段階的に上昇させ、当該ハイブリッドから発せられるシグナル強度の変化量を測定し、その変化量が負に転じた時にその温度を維持することを含む、請求項 5 乃至 11 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 13】 同一の反応条件を適用することが可能な同一の系内において、複数種類のプローブを使用し、複数種類の核酸についての情報を同時に検出することを特徴とする請求項 1 乃至 12 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 14】 前記のハイブリッド形成が、標的核酸を含む液体試料を、多孔質体に固定されたプローブに接触させることにより行われる、請求項 1 乃至 13 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 15】 前記の液体試料を、前記の多孔質体内を 1 回又は複数回往復させる工程を行うことを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】 前記のシグナルの検出を、蛍光標識の検出に基づいて行う、請求項 1 乃至 15 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 17】 標的核酸が、癌遺伝子、細胞内薬剤耐性遺伝子、細胞周期制御遺伝子、若しくはアポトーシス関連遺伝子の何れか、又はこれらの組合せである、請求項 1 乃至 16 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 18】 標的核酸を含む試料を入れるための試料貯蔵容器、核酸を

固定できる多孔質構造体を含み且つ当該容器と接続された核酸反応担体、当該試料が当該容器と当該核酸反応担体との間で、制御されながら漏れなく流動するための駆動手段、当該反応担体上での反応温度を制御するための温度制御手段、及び当該多孔質構造体において形成される標的核酸とプローブとの間のハイブリッドから発せられるシグナルを検出するための手段を含む核酸情報解析装置。

【請求項19】 前記の核酸反応担体へと接続され且つ標的核酸を含む試料とは異なる種類の溶液を貯蔵するための1以上の溶液貯蔵容器、及び適宜当該溶液貯蔵容器に含まれる各種の溶液を混合して前記核酸反応担体へと送る手段を更に含む、請求項18に記載の核酸情報解析装置。

【請求項20】 標的核酸が、癌遺伝子、細胞内薬剤耐性遺伝子、細胞周期制御遺伝子、若しくはアポトーシス関連遺伝子の何れか、又はこれらの組合せである、請求項18又は19に記載の核酸情報解析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、カイネティックに核酸情報を検出する方法及び装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子の突然変異情報の解析、疾病の予知や診断、ウイルスのタイピング等を行う遺伝子診断に関する技術が近年大幅に進歩している。例えば、正常な遺伝子配列を有する核酸、又は当該遺伝子配列中に既知の突然変異を含む核酸のそれぞれに相補的なDNAプローブを予め用意しておき、ここに、変異の有無が不明である試料DNAを各種プローブにそれぞれ別個にハイブリダイズさせ、これらのハイブリダイズの量を検出・比較し、より多くハイブリダイズが行われるプローブの方がサンプルDNAとの相補性が高いことを判断することが行われている。即ち、正常DNAに相補的なプローブへのハイブリダイズ量が多ければ、サンプルDNAは正常であり、逆に突然変異DNAに相補的なプローブへのハイブリダイズ量が多ければ、サンプルDNAは突然変異を起こしていると推定できる。

【0003】

ハイブリダイズの検出には、例えばサンプルDNAに検出可能な標識を施し、その標識を検出することで間接的にDNA量を検出する方法がとられている。一般にこのような標識には、蛍光やRI（放射性同位体）、化学発光等が用いられている。

## 【0004】

また、このようなDNAの持つ相補性を利用したハイブリダイズ反応をベースとし、数百個乃至数万個のDNAプローブを、格子状に配列させ、核酸試料を含む溶液をこのアレイ上でハイブリダイズさせることで、複数の遺伝子の情報を一括して検出するDNAマイクロアレイと呼ばれるシステムが普及し始めている。

## 【0005】

DNAマイクロアレイを利用すると、複数の遺伝子についての情報を同時に解析することが可能であり、通常はmRNAの発現解析に用いられることが多いが、一方でこれを遺伝子の突然変異やSNP（一塩基変異多型）に応用した例も見受けられる。

## 【0006】

一塩基の変異を高速かつ感度よく検出することは、一般に非常に困難である。そのため、例えば特開2001-50931号公報においては、DNAマイクロアレイにおいて電気化学反応を併用し、一塩基の変異を高速かつ感度よく検出する方法が提案されている。この文献では、DNAマイクロアレイの各アレイ要素ごとに電極を付与し、電圧を印加することで反応が高速化されている。

## 【0007】

また、ハイブリダイズを高速かつ、精度よく行う方法としては、特表2000-515251号公報に記載の方法が挙げられる。この方法は、多孔質構造を有する金属酸化物を反応担体として利用し、一方の面から他方の面へと溶液を駆動させることにより、サンプル溶液の拡散速度を高めて反応を高速化したものである。

## 【0008】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら従来の方法においては、ハイブリダイズの反応が非常に遅く（通

常は数時間乃至十数時間)、高速の検出を行うには、複雑な構成のチップを用いる必要があった。そのために装置や核酸の検出を行うチップが大型化したり、コスト高につながっていた。また、特異性を上げるために反応温度を上昇させる必要があり、これに起因して反応時間の遅延、そしてひいてはハイブリッドの検出時間の長時間化が生じていた。特に一塩基のみの変異の有無を精度よく検出しようとする場合においては、このような問題が顕著であった。

## 【 0 0 0 9 】

一塩基の変異検出の具体例としては、特表 2 0 0 0 - 5 1 1 4 3 4 号公報が挙げられる。この方法は、塩基の変異に対応したプローブを用意し、その特異性を利用して変異を特定するものであるが、一塩基変異の差を確実に検出するために、ミスマッチヌクレオチドを含むプローブを利用している。これはパーフェクトマッチしたハイブリッドと一塩基が変異したプローブとのハイブリッドについての  $T_m$  の差よりも、一塩基が変異したプローブとのハイブリッドと二塩基が変異したプローブとのハイブリッドについての  $T_m$  の差の方が大きくなることを利用したものである。しかしこの方法においては、絶対的なハイブリダイズ強度が低下するために、反応により多くの時間がかかることや、感度の点でも問題があった。

## 【 0 0 1 0 】

一塩基変異を検出する場合のように、DNA 全体の長さに対して一塩基のみしか変異していない場合には、プローブと標的 DNA の相補性に関しての程度の差が大きくなり、ハイブリダイズの度合いについての差が実質的に生じていないために、突然変異を検出することができなかった。つまり、一塩基の変異を検出するには、塩基長に対する変異の割合を高めるために、塩基長が短い方が好ましいが、一方で、配列が短か過ぎるプローブの場合には、反応温度を下げる必要性から、標的 DNA に非特異的にハイブリダイズする量が増えてしまう。そのために、精度の高い検出が行えないという問題が生じる。このように従来の方法では、一塩基の変異を精度よく且つ高速に検出することができなかった。

## 【 0 0 1 1 】

【課題を解決するための手段】



本発明者らは、上記の従来技術についての種々の問題点に鑑み、鋭意研究を進めたところ、シグナルのデータ取得をカイネティックに行うことにより、核酸についての、より多くの、より正確な、より信頼性のある情報を得ることが可能になることを見いだした。

## 【0012】

即ち、本発明の核酸情報検出方法は、標的核酸と、当該標的核酸配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するプローブとを接触させ、当該標的核酸と当該プローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの量に依存した量で発せられるシグナルを測定することにより、当該標的核酸の情報を検出する方法において、当該シグナルのデータ取得をカイネティックに行うことを含むことを特徴とする。

## 【0013】

そして本発明の核酸情報検出方法においては、前記のシグナルのデータ取得が、反応の測定条件または検出条件を変更しながら行われることが好ましく、より具体的には反応温度、又は反応溶液の組成、容量、若しくは種類のうちの少なくとも1つを変更しながら行われることが好ましく、特に、前記の変更が、反応温度についての変更であることが好ましい。

## 【0014】

本発明の核酸情報検出方法はまた、標的核酸の配列の少なくとも一部に対して完全に相補的な完全マッチプローブ、及び当該完全マッチプローブの少なくとも一部が変異した1以上の種類の不完全マッチプローブを、当該標的核酸と接触させ、当該標的核酸と当該完全マッチプローブ又は当該不完全マッチプローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの結合強度の違いに基づいて当該標的核酸の核酸情報を検出する方法において、当該ハイブリッドが発するシグナルを測定または検出する条件を連続的または段階的に変更しながら、当該シグナルのデータ取得をカイネティックに行うことを含むことを特徴とする。

## 【0015】

そして上記の核酸情報検出方法においては、前記のシグナルのデータ取得が、反応温度、又は反応溶液の組成、容量、若しくは種類のうちの少なくとも1つに

ついでの変更であることが好ましく、特に反応温度についての変更であることが好ましい。

【0016】

上記の核酸情報検出方法における反応温度の変更は、検出するハイブリッドの  $T_m$  値未満の温度から、 $T_m$  値を越える温度間の温度上昇、又はそのような温度上昇及び温度下降からなる 1 回又は複数回の温度サイクルであることが好ましい。

【0017】

反応条件の変更が、温度上昇である場合には、その間にシグナル強度の極大値及び／又はシグナル強度の変化量を測定してもよい。

【0018】

更に、本願発明の核酸情報検出方法は、上記の何れの態様において、前記のハイブリッドが発するシグナルを測定する温度を連続的又は段階的に上昇させ、それぞれの温度間における当該ハイブリッドから発せられるシグナル強度の変化を測定し、その変化量が負に転じた時にその温度を維持することができる。

【0019】

本発明の核酸情報検出方法は更に、上記の何れの態様において、同一の反応条件を適用することが可能な同一の系内において、複数種類のプローブを使用し、複数種類の核酸についての情報を同時に検出することを特徴とし、より具体的には、DNA マイクロアレイを利用することができる。

【0020】

本発明の核酸情報検出方法はまた、上記の何れの態様において、前記のハイブリッド形成が、標的核酸を含む液体試料を、多孔質体に固定されたプローブに接触させることにより行われることを特徴とする。

【0021】

そしてこの核酸情報検出方法においては、前記の液体試料を、前記の多孔質体内を 1 回又は複数回往復させる工程を行うことを含むことが好ましい。

【0022】

本発明の核酸情報検出方法においては、シグナルの検出を、蛍光標識の検出に

基づいて行うことができる。

【 0 0 2 3 】

本発明の核酸情報検出方法においては、標的核酸が、癌遺伝子、細胞内薬剤耐性遺伝子、細胞周期制御遺伝子、若しくはアポトーシス関連遺伝子の何れか、又はこれらの組合せとすることができる。

【 0 0 2 4 】

本発明の核酸情報検出装置は、標的核酸を含む試料を入れるための試料貯蔵容器、核酸を固定できる多孔質構造体を含み且つ当該容器と接続された核酸反応担体、当該試料が当該容器と当該核酸反応担体との間で、制御されながら漏れなく流動するための駆動手段、当該反応担体上での反応温度を制御するための温度制御手段、及び当該多孔質構造体において形成される標的核酸とプローブとの間のハイブリッドから発せられるシグナルを検出するための手段を含むことを特徴とする。

【 0 0 2 5 】

本発明の核酸情報検出装置においては、前記の核酸反応担体へと接続され且つ標的核酸を含む試料とは異なる種類の溶液を貯蔵するための 1 以上の溶液貯蔵容器、及び適宜当該溶液貯蔵容器に含まれる各種の溶液を混合して前記核酸反応担体へと送る手段を更に含んでもよい。

【 0 0 2 6 】

本発明の核酸情報検出装置においては、標的核酸が、癌遺伝子、細胞内薬剤耐性遺伝子、細胞周期制御遺伝子、若しくはアポトーシス関連遺伝子の何れか、又はこれらの組合せとすることができる。

【 0 0 2 7 】

【発明の実施の形態】

(定義)

本願明細書においては、以下の用語を以下に定義した意味において用いる。

「核酸」とは、DNA、RNA、及び人工的ヌクレオチドを含むDNA又はRNAの何れをも意味する。

「ハイブリッド」とは、上記の核酸の何れかの間に形成される同種間及び異種

間の二重鎖を意味し、DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNA等が含まれる。

また「核酸の情報」、又は「核酸情報」とは、核酸の配列自体、核酸配列中の変異の有無、核酸の配列に依存して変化する物性値（例えば $T_m$ ）、及び核酸の量（例えばmRNAのコピー数）を含む。

「シグナル」とは、適当な手段により適宜検出・測定可能な信号であって、蛍光、放射能、化学発光等が含まれる。

「カインेटィックに行う」とは、データの取得を、ある定められた時点においてのみではなく、時間的に連続した又は断続した各時点で測定を行うことを意味する。

#### 【 0 0 2 8 】

以下においては、本発明の実施態様についての、構成、実施方法、効果等について説明する。

一の態様において本発明の核酸情報の検出方法は、標的核酸と、当該標的核酸配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するプローブとを接触させ、当該標的核酸と当該プローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの量に依存した量で発せられるシグナルを測定することにより、当該標的核酸の情報を検出する方法において、当該シグナルのデータ取得をカインेटィックに行うことを含むことを特徴とする。

#### 【 0 0 2 9 】

標的核酸は、ゲノムからのDNA、細胞から抽出されたmRNA、PCRにより増幅されたDNAや、プラスミドDNA等、種々のものとするのが可能であり、プローブとのハイブリダイズに悪影響を及ぼす夾雑物等が含まれていない限り、これは特に限定されるものではない。しかし、精度の高い実験を行うためには、当該技術分野において既知の種々の精製技術により純度をより高めておいた試料を用いることが好ましい。また、標的核酸は、プローブを合成するために、ハイブリダイズを行う部分についての少なくとも一部の配列が既知であることが好ましい。標的核酸への標識の導入は、mRNAの逆転写やPCRにより行うことができる。

## 【 0 0 3 0 】

標的核酸とプローブとの接触は、核酸を、他の核酸との間の二重鎖形成を阻害しないようにして固定することが可能な担体上に固定化されたプローブに対して、標的核酸を含む溶液等を接触することにより行うことができる。

## 【 0 0 3 1 】

標的核酸-プローブ間のハイブリッド形成は、ハイブリダイズする部分の配列情報に依存した結合強度の違いに基づいて決定された条件において行うことができるが、例えばシグナルを測定する条件の変更が、温度の変更である場合には  $T_m$  の違いに基づいて決定された温度において行うことができる。 $T_m$  よりも低い、 $T_m$  近傍にある温度においては、標的核酸-プローブ間での特異的な二重鎖形成が生じやすく、非特異的な二重鎖の形成は生じにくい、ハイブリッドの形成には時間がかかる。一方、このように特異的な二重鎖形成が生じやすい温度よりも更に低い温度においては、二重鎖形成の反応時間は短縮されるが、標的核酸-プローブ間の非特異的な結合量が増大してしまう。従ってハイブリダイズ反応の温度の設定は、要求される実験精度と必要な反応時間とのかねあいで決定される。また、その他の反応条件についても同様にこれを考慮して決定される。

## 【 0 0 3 2 】

ハイブリッドの量に依存した量で発せられるシグナルの測定は、通常、試料となる核酸に予め導入しておいた標識を用いて行われるが、例えば蛍光標識した試料核酸や、放射性同位元素を含む d N T P から合成した試料核酸等を使用することができる。標識の導入については、種々の核酸標識技術（既存のもの、新規に開発されるものを問わない）を使用することが可能である。更に、ハイブリッド二重鎖に結合する試薬をハイブリッド形成後に添加し、それを検出することによりハイブリッドを検出することも可能である。

## 【 0 0 3 3 】

ハイブリッドの検出を蛍光により行う場合の例としては、PCRにより試料核酸を合成する際に、予めプライマに蛍光標識を導入しておいたものを利用する方法や、試料核酸に対して、化学反応や酵素を利用して蛍光標識を導入する方法が挙げられる。蛍光標識の導入に関しては、一般的に用いられている標識方法を利

用することができる。

【0034】

シグナルデータの取得は、時間に関して定点ではなく、カイネティックに行う。より具体的には、カイネティックにデータ取得する時間は、ハイブリッド形成反応の反応条件に応じて異なるものであるが、概して、ハイブリッド形成反応開始後、合計で数分間から数時間程度にわたる。もっとも、反応条件いかんによっては、この範囲外の合計時間だけデータ取得を行うことも可能である。

【0035】

上記したように、本願発明のこの態様においては、従来の時間に関する定点観測に基づく静的なデータ取得とは異なり、データ取得がカイネティックに行われることを特徴としている。従って本願発明においては、標的核酸-プローブ間のハイブリッド形成の時間的变化を追跡することが可能になり、そしてこの時間的变化の追跡により、標的核酸についてのより多くの、より正確な、そしてよりばらつきの少ない情報を得ることが可能になる。即ち、カイネティックなデータ取得を行う場合には、反応状態の経過をモニタリングすることが可能になり、反応の進行状況を厳密に検出することが可能になる。そして、反応の経過全体から、より正確な核酸情報を入手できるようになる。

【0036】

上記の実施態様においては、前記のシグナルのデータ取得が、反応の測定条件または検出条件を変更しながら、より具体的には反応温度、又は反応溶液の組成、容量、若しくは種類のうちの少なくとも1つ、より好ましくは反応温度を変更しながら行うことも可能である。例えばシグナルのデータ取得を反応温度の変更と連動させながら行う場合、ハイブリダイズ反応の反応変化量、反応の立ち上がり、反応条件の変化に対する反応系の応答具合等の情報についても併せて取得することが可能となり、より有益である。

【0037】

ここで「反応温度の変更」とは、標的核酸とプローブ間でのハイブリダイズ反応が行われる系内の温度を変更することを意味し、「反応溶液の組成の変更」とは、反応溶液に含まれる塩や添加物等の組成やpHを変更することを意味し、「

反応溶液の容量の変更」とは、反応系からの反応溶液の抜き差しによる容量の変化を意味し、そして「反応溶液の種類の変更」とは、水溶液やアルコール溶液といった種類を変更することを意味する。

## 【0038】

標的核酸-プローブ間のハイブリッド形成は、配列情報に基づいた推定の最適条件において行われるものであり、従ってその条件が本当に最適条件であるかはわからないのが普通である。そのために、静的に測定を行う従来の核酸情報検出方法においては、最適ではない条件下でのデータ取得を行っている場合には、データの信頼性が十分ではなかったり、データのばらつきが存在したりするなどの問題が存在していた。

## 【0039】

しかし、本願発明の上記態様におけるように、カイネティックなデータ取得と連動して反応条件を変更することにより、複数の反応条件でハイブリダイズ反応を進行させ、それを経時的に測定することが可能となる。そのためこの実施態様においては、データの信頼性等についての上記した従来の問題が解決されることとなる。

## 【0040】

ある条件下においてハイブリッド形成が進行している場合には、カイネティックなデータ取得によって、ハイブリッド反応のモニタリングが行われることになる。そのため、ハイブリッド反応の進行をより厳密に検出することが可能となる。従って、シグナルのデータ取得をこのようにカイネティックに行う本願発明においては、反応の初期段階における反応変化率を測定し、それによって反応の終了時点を予測することも可能となる。これは、核酸検出のための反応時間を短くすることに役立つものである。更にこれを発展的に利用する場合、ハイブリッド形成の最適反応条件をカイネティックなデータ取得で決定し、反応条件を最適なものへと移行することや、広範な反応条件にわたるハイブリッド形成反応を追跡することに役立てることも可能である。

## 【0041】

上記した本願発明の実施態様に属するものとしては、試料中の特定遺伝子の転

写量やコピー数の比較、核酸配列中における特定配列（正常型又は変異型）の検出、SNPに代表されるような遺伝子多型検出、ウイルスや細菌のタイピング等が挙げられる。

## 【 0 0 4 2 】

別の態様において本願発明の核酸情報検出方法は、標的核酸の配列の少なくとも一部に対して完全に相補的な完全マッチプローブ、及び当該完全マッチプローブの少なくとも一部が変異した1以上の種類の不完全マッチプローブを、当該標的核酸と接触させ、当該標的核酸と当該完全マッチプローブ又は当該不完全マッチプローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの結合強度の違いに基づいて当該標的核酸の核酸情報を検出する方法において、当該ハイブリッドが発するシグナルを測定する条件を連続的又は段階的に変更しながら、当該シグナルのデータ取得をカイネティックに行うことを含むことを特徴とする。

## 【 0 0 4 3 】

この実施態様においては、ハイブリダイズ反応の進行を非常に精密に行うことを可能とするものとなっている。例えば反応温度を連続的又は段階的に変更しながらシグナルのデータ取得をカイネティックに行うと、1塩基のみにおいてしか異なっていない核酸配列の変異の検出を行うことも可能になる。

## 【 0 0 4 4 】

より具体的には、例えばPCR産物等の標的核酸を準備し、その天然の配列の少なくとも一部に完全に相補的なプローブと、その既知の配列のうちの、同一の1塩基が変異した3つの異なるプローブを準備する。これら4種類のプローブは、その同一の1の塩基部分において、それぞれA、T、G、Cの何れかのヌクレオチドを有していて、その他の部分においては完全に同一となっている。これら4種類のプローブを使用して、標的核酸とのハイブリダイズを、反応温度を変更しながら測定する。標的核酸に完全マッチするプローブとのハイブリッドについての $T_m$ 近傍の温度においては、標的核酸と、これに完全にマッチしないプローブとの間のハイブリッドは、より不安定であるために、標的核酸とプローブとが解離した状態側に平衡が傾いていると考えられる。そのため、この $T_m$ 近傍の温度においては、標的核酸と、これに完全にマッチするプローブとの間のハイブリ



ッドが最も強くシグナルを発しているはずであり、一方、標的核酸と、これに完全にはマッチしないプローブとの間のハイブリッドは、存在していたとしてもその量は非常に少なく、よって、シグナル強度は強くない。このようなシグナル強度の違い、又はシグナルの有無から、標的核酸中において変異していると考えられる塩基が、シグナル強度を基にして、A、T、G、Cの何れかであることを同定することが可能となる。従来方法においては、ハイブリダイズを行う反応温度は定点であったために、その反応温度が当該ハイブリッド形成に最適ではない場合、不完全マッチプローブとのハイブリダイズの方がより強いシグナルを与えることも考えられた。しかし、本願発明のこの態様においては、柔軟に反応温度等の反応条件を変更できるために、このような誤った結果がでることを効果的に防ぐことが可能となっている。

## 【0045】

従来方法において、このように1塩基のみが変異している標的核酸を検出・区別するには、反応温度を $T_m$ 近傍の温度にまで上昇させる必要性から、長い反応時間を要していた。しかし、本願発明のこの実施態様の方法においては、より柔軟な温度制御が可能であることから、例えば、 $T_m$ よりも低い温度からハイブリッド形成を開始し、一定量のハイブリッド量を確保した後に、 $T_m$ 近傍にまで反応温度を連続的又は段階的に上昇させることにより、ハイブリッド反応時間を短縮することが可能となる。更には $T_m$ 近傍の温度範囲での細かな温度制御により、非特異的なハイブリッド形成を除外して、より精度の高い測定を行うことが可能となる。

## 【0046】

本願発明のこの態様においては、複数の塩基において変異を含むプローブを適宜用意して用いれば、1塩基のみならず、複数の塩基の変異を同時に検出することも可能である。

## 【0047】

このように、反応温度の変更を、シグナルデータの取得と連動して変更することにより、上記のような効果が得られるが、反応温度以外の反応条件、例えば反応溶液の組成、容量、又は種類の変更によっても同様の効果が得られる。より具

体的には、ハイブリッド形成反応の反応溶液の塩の種類や濃度を変更することや、異なる緩衝液を使用することによる pH 勾配の形成を通じて、ハイブリダイズ反応の条件を変更することも可能である。このような反応溶液の組成等の変更は、反応温度の変更と同様に、ハイブリッド形成へ影響を与える。

## 【0048】

上記した本願発明の実施態様においては、反応時間の短縮化等の観点より、反応温度の変更は、温度上昇であることが好ましい。温度を上昇する場合、特にハイブリッドの推定  $T_m$  よりも低い温度から開始する場合には、非特異的な結合が生じるものの、標的核酸とプローブ間のハイブリッド形成が促進され、また、非特異的な結合は、その後の温度上昇により除去できることから、より好ましいと考えられる。従って、温度上昇の場合には反応時間が短縮されるのみならず、ハイブリッド反応の精度も上昇するという効果を得ることが可能となる。

## 【0049】

反応温度の変更については、 $T_m$  値未満の温度から、 $T_m$  値を越える温度間の温度上昇が好ましいが、これを更に発展させて、 $T_m$  値未満の温度から、 $T_m$  値を越える温度間の温度上昇と温度下降からなる 1 回又は複数回の温度サイクルとすることにより、ハイブリダイズ反応のプロファイルを取得することが可能となる。これにより、更に信頼性の高いデータを取得することが可能となる。

## 【0050】

反応温度の上昇を行う場合には、上昇中のシグナル強度の極大値を測定することにより、ハイブリッドの  $T_m$  値を定性的又は定量的に求めることが可能となる。温度上昇を段階的に行う場合は、おおよその  $T_m$  値が決定でき、温度上昇をより細かく段階的に（たとえば  $1^{\circ}\text{C}$  以下の間隔で）、又は連続的に行えば、より正確な  $T_m$  値を決定することも可能である。この  $T_m$  値の違いは、各核酸の配列における変異の有無や違いを反映しているものであるので、本発明のこの態様により、変異の検出をより厳密に行うことが可能となる。

## 【0051】

また、この実施態様においては、ハイブリッドからのシグナルを検出するのみならず、シグナルの変化量を計測すれば、測定精度を更に高めることも可能と

なる。

【 0 0 5 2 】

更に別の好ましい態様において、本発明の核酸情報検出方法は、ハイブリッドが発するシグナルを測定する温度を連続的又は段階的に上昇させ、当該ハイブリッドから発せられるシグナル強度の変化を測定し、その変化量が負に転じた時にその温度を維持することを含むことを特徴とする。

【 0 0 5 3 】

この実施態様によれば、未知の変異についての検出をより精度良く行うことが可能となる。即ち、反応温度を連続的又は段階的に変化させる間のシグナル強度の変化を検出し、そのシグナル強度の変化量が負に転じたところで反応温度を維持すると、その温度よりも高い温度の $T_m$ 値を有するハイブリッド種からの信号は、その強度が保たれるか又は更に上昇するが、一方、維持された温度以下の $T_m$ 値を有するハイブリッド種からの信号は、徐々に減少していくと考えられる。従って、 $T_m$ 値の違いを利用して、完全にマッチしたハイブリッド種と、完全にはマッチしていないハイブリッド種とをより精度良く区別することが可能となり、完全にマッチしたプローブの配列に基づいて、未知であった変異を同定できる。

【 0 0 5 4 】

他の実施態様において本願発明の核酸情報検出方法は、同一の反応条件を適用することが可能な同一の系内において、複数種類のプローブを使用し、複数種類の核酸についての情報を同時に検出することを特徴としている。より具体的には、DNAマイクロアレイを利用する。

【 0 0 5 5 】

本願発明の核酸情報検出方法において使用できるDNAマイクロアレイについては特に限定されるものではなく、通常のマイクロアレイを利用することができる。使用可能なマイクロアレイの一例としては、複数のマイクロアレイがスライドチップ上に設けられたものであって、各マイクロアレイ中に、複数のプローブスポットが存在するものを挙げることができる。ここで、プローブスポットとは、プローブを固定するための最小単位のことである。

## 【0056】

スライドチップの大きさは、通常は0.5-20.0 cm X 0.5-20.0 cm X 0.01-1.0 cmの範囲である。また、マイクロアレイの大きさは、通常は3.0 mm<sup>2</sup>-16 cm<sup>2</sup>の範囲にある。更に、プローブスポットは、略円形、略矩形、又は多角形とすることができ、その直径又は一辺の長さは、通常、数百μm程度である。また、1マイクロアレイ中のプローブスポットの数は、10-1000の範囲にあることが通常である。実験条件に応じて、ここに定義した範囲以外の規格のDNAマイクロアレイを使用することも勿論可能である。

## 【0057】

DNAマイクロアレイを利用する場合、同一の条件を全プローブスポットに課することが可能であり、複数のプローブを利用すれば、複数の核酸についての情報を一度に検出することが可能である。

## 【0058】

DNAマイクロアレイを用いるこの実施態様においても勿論のこと、本願発明の一の特徴であるカイネティックなシグナルデータの取得が行われることに起因して、経時的な測定を行わない従来の静的測定の場合に問題となっていた、ハイブリッド形成の反応時間が長いという問題を解決することも可能である。即ち、上記したように、ハイブリッド形成をそのT<sub>m</sub>よりも低い温度から開始し、順次反応温度を上昇させることにより、ハイブリッド形成反応を短縮化することが可能となる。

## 【0059】

好ましい一の態様において本発明の核酸情報検出方法は、標的核酸とプローブとの間のハイブリッド形成が、標的核酸を含む液体試料を、多孔質体に固定されたプローブに接触させることにより行われることを特徴とする。

## 【0060】

この態様においては、プローブの固定が、従来の基板表面とは異なり、多孔質構造を有する担体に対して行われるため、核酸を固定化する表面積が飛躍的に増大し、これに起因して核酸情報の検出の速度及び感度が上昇する。ここで用いら

れる多孔質体としては、核酸の固定に適する何れ多孔質体をも意味し、特に限定されるものではないが、例としては、陽極酸化により作製された酸化アルミニウム膜、例えばWhatman社の商品名Anodiscを挙げることができる。

#### 【 0 0 6 1 】

本願発明の他の好ましい態様においては、変更するシグナル測定条件のそれぞれの条件において、標的核酸を含む液体試料を、前記の多孔質体内を1回又は複数回往復させる工程を行うことを含むことが好ましい。このように多孔質体内を、標的核酸を含む試料を往復させることにより、多孔質内に固定化されたプローブと標的核酸との接触頻度が増えることになり、これは反応の更なる進行及び更なる感度の上昇に寄与することとなる。ここで、反応温度等の反応条件の変更は、試料の多孔質体内での往復工程と連動して行うことが好ましい。

#### 【 0 0 6 2 】

このように、多孔質内を1回又は複数回、試料を往復させるためには、ハイブリッド形成反応を行う反応担体中の多孔質部分の内外において試料の流動を強制的に制御するための手段を設ける必要がある。しかし、この手段を用いて試料の往復を一定の時間制御下にて行うと、反応系の温度制御をより正確に行うことが可能となり、検出精度の上昇や、より細かなデータ取得を可能にするという利点が生じる。

#### 【 0 0 6 3 】

本願発明の核酸情報検出方法についての何れの実施態様においても、ハイブリッドの検出は、蛍光標識に基づいて行うことが可能である。使用する蛍光標識の種類としては、FITC、ローダミン、Cy3、Cy5、テキサスレッド等を挙げることができるが、これら以外のものを利用することができる。

#### 【 0 0 6 4 】

本願発明の核酸情報検出方法により検出可能な標的核酸は、特に限定されるものではないが、非限定的な例としては、癌遺伝子、細胞内薬剤耐性遺伝子、細胞周期制御遺伝子、及びアポトーシス関連遺伝子等を挙げることができる。

#### 【 0 0 6 5 】

本願発明は、上記の核酸情報検出方法に特に使用できる、核酸情報解析装置を

提供するものであるが、これは、標的核酸を含む試料を入れるための試料貯蔵容器、核酸を固定できる多孔質構造体を含み且つ当該容器と接続された核酸反応担体、当該試料が当該容器と当該核酸反応担体との間で、制御されながら漏れなく流動するための駆動手段、当該反応担体上での反応温度を制御する手段、及び当該多孔質構造体において形成される標的核酸とプローブとの間のハイブリッドから発せられるシグナルを検出するための手段を含むことを特徴とする。この装置の一実施例についての概略は、図 1 に示される通りである。図 1 に示される装置は、蛍光顕微鏡をベースとした検出装置であり、各コンポーネントが、PC によりその動作を制御されているものである。

## 【 0 0 6 6 】

ここで試料貯蔵容器（図 1 では図示せず）としては、試料核酸の貯蔵に適するものであれば特に限定されるものではない。また、核酸を固定できる多孔質構造体を含む核酸反応担体についても、核酸の固定に適し、ハイブリッドの形成を阻害するような材質でなければ特に限定されるものではないが、核酸反応担体の具体的な例としては、上述の DNA マイクロアレイを挙げることができ、特に多孔質構造を有する担体に所望の核酸プローブを固相化させたものが取り付けられるようになっているものが好ましい。ここで試料貯蔵容器と、核酸反応担体との間の構造については、試料核酸を多孔質構造体へ 1 回または複数回漏れなく往復流動させるために、その構造体は密閉されていることが望ましく、更に、試料核酸の全量を保持できるだけの容量を有することが好ましい。そして試料溶液を試料貯蔵容器と核酸反応担体との間で流動させるための溶液駆動手段としては、 $\mu$ l 単位の溶液の輸送に適したポンプ類を使用することができ、核酸反応担体上での反応温度を制御する温度制御手段としては、0.1℃程度の単位で温度設定できるものが好ましく、これは核酸反応担体のみならず、試料貯蔵容器、並びに試料貯蔵容器及び核酸反応担体の間の流路の環境温度を同一の温度に設定できるものであることが好ましい。ハイブリッドから発せられるシグナルを検出するための手段としては、例えばハイブリッドの標識が、蛍光体である場合には、核酸反応担体からの光学的信号を撮像するための CCD カメラ（画像検出部）を備えた顕微鏡等とすることができる。これらの顕微鏡、画像検出部、溶液駆動手段、及

び温度制御手段は、いずれも適宜 P C により制御されていることが望ましい。そして得られた画像は P C の演算処理により各プローブ毎の信号情報に変換され、その絶対値、相対値、変化量を反応温度や駆動回数、時間等のパラメータとの演算処理により、最終的な遺伝子の変異情報を表示できるような構成となっている。

#### 【 0 0 6 7 】

本願発明の核酸情報解析装置の一の態様においては、当該装置は、前記の核酸反応担体へと接続され且つ標的核酸を含む試料とは異なる種類の溶液を貯蔵するための 1 以上の溶液貯蔵容器、及び適宜当該溶液貯蔵容器に含まれる各種の溶液を混合して前記核酸反応担体へと送る手段を更に含むことが好ましい。

#### 【 0 0 6 8 】

当該装置において、核酸反応担体へと接続され且つ標的核酸を含む試料とは異なる種類の溶液を貯蔵するための 1 以上の溶液貯蔵容器を設けることにより、反応温度以外の反応条件、例えば反応溶液の組成や p H を変更させながらハイブリダイズ反応を進行させることが可能となる。また、溶液貯蔵容器に含まれる複数の溶液を混合して核酸反応担体へと送る手段を有する場合には、塩濃度や p H についての勾配を設けて反応条件を変更することが可能となる。

#### 【 0 0 6 9 】

本発明の核酸情報解析装置において解析できる核酸の種類は特に限定されるものではないが、非限定的な標的核酸の例としては、癌遺伝子、細胞内薬剤耐性遺伝子、細胞周期制御遺伝子、またはアポトーシス関連遺伝子が挙げられる。

#### 【 0 0 7 0 】

##### 【実施例】

##### (実施例 1)

##### 実験方法

プローブとして、配列番号 1-4 に示される 4 種のオリゴ DNA を合成し、陽極酸化で作製した酸化アルミニウム基板に固相化した。反応の検証のために、配列番号 5 に示されるオリゴ DNA をサンプルとして、ハイブリダイズ反応を行った。このオリゴ DNA は、その 3' 側を F I T C で標識した。配列番号 5 のオリ

ゴDNAの配列は、配列番号1のプロープと相補的なものとなっている。また配列番号2-4のプロープは、配列番号5のオリゴDNAの相補鎖に対し、その中央の塩基を一塩基変異させたものとなっている。

このオリゴDNAサンプルを1XSSPE緩衝液で希釈し、10nMの濃度として、各プロープとのハイブリダイズ反応を基板上で行った。核酸反応担体である基板への溶液の流動と連動して、核酸反応担体の温度を制御した。具体的な条件は以下の通りである。

サイクル数	温度
1-5	25℃
6-10	40℃
11-15	60℃

各サイクルは、試料貯蔵容器と核酸反応担体との間の溶液の往復に1分間かけて行った。

#### 【0071】

#### 結果

図2に結果の図を示す。図中には配列番号1及び2のプロープに対する検出シグナルを示してある。図2の(A)の領域は、25℃でハイブリダイズを行った結果を示すものであり、溶液の流動サイクル数の増大とともに、シグナル強度は上昇している。ここでは、標的核酸とプロープ間の非特異的な反応も生じていることから、ハイブリッド形成を促進する効果がある。しかし、非特異的な反応のため、完全マッチプロープ（配列番号1のプロープ）と、不完全マッチプロープ（配列番号2）の間のシグナルの差は小さい。(B)の領域は、反応温度を40℃とした場合の結果を示すものである。配列番号1のプロープが形成しているハイブリッドに由来するシグナルは上昇しつづけ、配列番号2のプロープが形成しているハイブリッドに由来するシグナルの強度はやや減少している。このように、完全マッチプロープと不完全マッチプロープとの間にシグナル強度についての差異が生じている段階で検出を行うことにより、輝度差が大きいために、より精度よく核酸配列の検出を行うことが可能となる。ここでは配列番号1のプロープが形成するハイブリッドに由来する信号強度が最も強く現れた。図中には示さなかったが



、配列番号 3 及び 4 のプローブが形成するハイブリッドに由来する信号についても、配列番号 2 のプローブの場合と同様の結果であった。したがって、温度制御を行うハイブリダイズ反応により、一塩基の変異を精度よく検出できることが検証できた。

## 【 0 0 7 2 】

## (実施例 2)

## 実験方法

細胞株由来の p53 遺伝子の変異を検出する実験を行った。試料として、ヒトリンパ芽球腫 WTK1 の細胞株を利用した。この細胞株では、p53 遺伝子のエクソン第 7 コドンの 273 部分が ATG から ATA へ変異していることが確認されている。この変異部分を含む 98bp を PCR により増幅処理した。PCR の際のプライマの 5' 側には F I T C を使い、蛍光標識を行うことで、増幅産物への蛍光標識を行った。得られた増幅 DNA を水に溶解し、95℃ で熱変性させた。10 分後に急冷し、ハイブリダイズ用の緩衝液に溶解することで、一本鎖の DNA サンプルとした。増幅した配列は、配列番号 6 に、そして検出した配列部分は、配列番号 7 に示した。

一方変異検出のために、変異が想定される部分を中央においたプローブを複数個合成し、多孔質の構造を有する基板上に固相化した。固相化したこれらのプローブは配列番号 8-11 に示したとおりである。ここで、配列番号 7 に相補的なプローブは配列番号 10 のプローブである。これらの試料を用いたハイブリッド形成反応は、温度変化と連動させて行い、更に試料溶液を、多孔質構造を有する核酸反応担体への出し入れ（駆動制御）を行った。これらの反応のうち、配列番号 10 及び 11 が形成するハイブリッドに由来するシグナル情報の結果を図 3 に示す。これは、配列番号 10 及び 11 のプローブが形成するハイブリッドに由来するシグナルの強度を、配列番号 10 のプローブが形成するハイブリッドに由来するシグナル強度を 100 とした場合の相対的強度比で示したものである。

## 【 0 0 7 3 】

## 結果

温度の上昇とともに、完全マッチと一塩基のミスマッチを含む不完全マッチとの間のシグナルの強度比の差が大きくなり、室温では検出できなかった一塩基の

識別が、温度の制御により可能であることが確認された。

【 0 0 7 4 】

(実施例 3)

実験方法

本願発明に基づいて行った、K-Rasガン遺伝子のCodon12近傍の変異の有無を決定する方法を示す。マイクロアレイ上に、Codon12の部分に突然変異を導入した7種類のK-Rasガン遺伝子プローブ（配列番号15-21）を、図4に示される配置でスポットする。このマイクロアレイとサンプルである蛍光標識されたK-Ras遺伝子（配列番号12及び13のプライマを利用してPCRにより増幅済）との間の $T_m$ を測定した。この時に用いる実験ステップについて記載する。実験ステップは、1) 蛍光標識サンプルの作成、2) マイクロアレイの作製、3) サンプルのマイクロアレイに対するハイブリダイゼーション、4) データ解析、の4つのステップから構成される。

【 0 0 7 5 】

1) 蛍光標識サンプルの作製：対象遺伝子セットの増幅、および蛍光標識を行う。この時に用いるサンプルとしては、人体の一部であれば特に制限はないが、主にガン化した組織などから採取した組織切片や、マイクロダイセクション法などによって得られた細胞片、あるいは培養細胞などが用いられる。本実施例においては、宝酒造から発売されているヒトK-Ras遺伝子テンプレートセット（Cat#7242）を用いた。7種類のテンプレートに対して、同じくK-Ras遺伝子Codon12の部分を増幅できるPCRキット（Cat#7112）を用いて遺伝子増幅する。この時、配列番号12及び13に示されるような、5'末端にFITCの蛍光標識が入れられたアンチセンスプライマーを使用した。PCRの終了後に3%NuSieve(FMC)で作成したアガロース電気泳動を行なって、増幅産物を確認した。さらに蛍光標識を増強するために、得られた増幅サンプルを再度Asymetrix PCR法で処理した。Asymetrix PCR法は、最初のPCR法からセンス鎖のプライマを除いた組成、温度サイクルを使用する。PCR産物に10%(V/V)となるように3M酢酸アンモニウム(Wako)を加え、さらに70%濃度となるようにエタノール(Wako)を加えた。-20度で一昼夜静置し、12,000rpm x 2 minの遠心によってPCR産物を沈殿させた。2回70%エタノールによ

って沈殿を洗浄したあと、SpeedVac(Savant社)によって乾燥させた。

【 0 0 7 6 】

2) マイクロアレイの作製: K-Ras遺伝子の塩基配列は、GenBankなどのデータベースを参照し、配列番号15-21のプローブをマイクロアレイに固相化した。合成したプローブをマイクロアレイに図4のレイアウトとなるようにピエゾ素子を利用した微量分注システムを利用して分注した。図4において、スポットA1、A5、C5、G1、G5においては、配列番号14のネガティブ対照プローブに蛍光標識したもの(スポット位置参照用)が配置されている。スポットA2-A4においては、配列番号15のK-RAS-Va1変異体に対応するプローブが、スポットB2-B4においては、配列番号16のK-RAS-Asp変異体に対応するプローブが、スポットC2-C4においては、配列番号17のK-RAS-Ala変異体に対応するプローブが、スポットD2-D4においては、配列番号18のK-RAS-Ser変異体に対応するプローブが、スポットE2-E4においては、配列番号19のK-RAS-Cyc変異体に対応するプローブが、スポットF2-F4においては、配列番号20のK-RAS-Arg変異体に対応するプローブが、そしてスポットG2-G4においては、配列番号21のK-RAS-N天然配列に対応するプローブが、それぞれ配置されている。

【 0 0 7 7 】

3) リアルタイムハイブリダイゼーションモニタリング: 乾燥させたエタノール沈殿に、50 $\mu$ lの純水を加えてよく溶解し、蛍光標識サンプルとした。ハイブリダイゼーション用溶液として、3 xSSPE(Sodium 燐酸緩衝液、技術資料: DNA マイクロアレイと最新PCR法、細胞工学別冊ゲノムサイエンスシリーズ1 秀潤社参照)、10%(V/V)ExpressHyb(Clontech社)にサンプルを10%溶液となるように懸濁した。ハイブリダイゼーションの分析は、オリンパス光学社製のBX-51TFRに冷却CCDカメラを接続した実験システムによって行なった。この実験システムは、反応フィルターの周りの溶液駆動と温度制御、および蛍光スポットの画像の記録を自動的に行なうことが出来るように設計されている。直径6mmのマイクロアレイが設置された専用チャンバーの反応部分に、50 $\mu$ Lの反応溶液を加え、溶液駆動と温度変化を与え、蛍光画像を撮像した。

## 【 0 0 7 8 】

テンプレート由来の蛍光標識サンプルを用いて得られた実験結果を示す。対照試料として、正常なK-Ras遺伝子配列を持つPCR産物を使用した。ハイブリダイゼーション時に、温度変化を与えた場合に得られたマイクロアレイの蛍光スポットの時間変化を図5において示した。図5は、下側から、反応後1分、10分、20分、30分、40分の蛍光画像であり、溶液駆動を伴い、且つ溶液の温度変化を与えるようにプログラムした。温度に関しては、最初に室温であった反応チャンバーが、最終的には72度となるように設定してある。図からも明らかなように、反応後すぐにほとんどのスポットの蛍光輝度が上昇し、さらに温度を上げるに従って、図のE2、E3、E4に相当する部分にスポットしたCysスポット (codon12の配列TGT) が最も高いレベルの蛍光を示している (20-30分後)。この温度環境では、固相化された7種類の異なる塩基配列を持つプローブの中で、サンプルに対して完全に配列の一致したプローブではなく、むしろ $T_m$ の計算値の低いプローブに対して、サンプルがより強く結合していることがわかる。さらに反応チャンバーの温度を上げることにより、次第にこのCysスポット (E2-E4スポット) の蛍光強度は減少し、72度の温度となった段階で、実際に標的核酸に対してパーフェクトマッチであるGly(Codon12の配列GGT)の蛍光スポット (G2-G4) のみが観察されるようになる (40分後)。この一連の画像を温度条件などの情報と共にハードディスクに保存した。

## 【 0 0 7 9 】

4) 解析：得られた画像を変異検出用にプログラムした解析ソフトウェアを利用して解析した。実験の結果得られた蛍光画像情報を元にして標的核酸とプローブの間の $T_m$ 値とアフィニティの程度を決定することが出来る。この結果、3)の実験から、サンプルのK-RasCodon12部分のプローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションの程度が環境要因によって変化し、ある温度条件においてはミスマッチプローブの方がマッチしたプローブよりもより高いアフィニティを持つことが分かった。またプローブとサンプルの間のアフィニティは、ミスマッチの塩基配列によって異なることが画像から直感的にも理解出来る。このようにして、一つの反応アレイによってサンプルと複数のプローブ間のリアルタイムなアフィニティ

の解析とハイブリダイゼーションのモニタリングが行なえることが示された。この実験システムを使用して実際の $T_m$ の値を求めることが出来ると共に、DNAの二重らせんの安定性についての新しい知見が得られることが期待出来た。実際にさまざまな突然変異を持つプローブへの親和性を解析したり、プロモーター部分の転写効率を測定することによって、より正確なハイブリダイゼーションの機構の解析に利用できる。

## 【 0 0 8 0 】

## (実施例 4)

この発明に基づいて行ったP53ガン抑制遺伝子とK-Rasガン遺伝子を同時に検査する実験ステップについて記載する。実験ステップは1) 蛍光標識サンプルの作製、2) マイクロアレイの作製、3) DNAチップに対するハイブリダイゼーション、4) データ解析、の4つのステップから構成される。

## 【 0 0 8 1 】

1) 蛍光標識サンプルの作製：対象遺伝子セットの増幅、および蛍光標識を行う。この時に用いるサンプルとしては、人体の一部であれば特に制限はないが、主にガン化した組織などから採取した組織切片や、マイクロダイセクション法などによって得られた細胞片、あるいは培養細胞などが用いられる。実施例として、正常な人の口腔内から採取した扁平上皮細胞を用いた。1MNaClを溶解した食塩水で数回うがいをしたあと、PBSによってもう一度よくうがいをしたものを細胞片の浮遊液とした。この細胞浮遊液を2000 rpm x 10 minの遠心によって沈殿させ、0.2  $\mu$ g/mLのProtease K(Wako)と、0.1%SDS(SDS)に調整したPBSからなる細胞溶解液に懸濁する。サンプルの入った細胞溶解液を37度で30分反応させたあと、95度で30分熱処理を行ない、ProteaseKの活性を失活させる。反応後のサンプルを1.5mLのエッペンドルフのチューブに移し、12,000 x 2 minの遠心分離を行なって、溶解しなかった細胞片を沈殿させる。この遠心上清を核酸の抽出液として用いた。得られた核酸抽出液をPCRマスターミックスに懸濁し、50サイクルのPCR反応を行なった。マスターミックスは宝酒造のPCR Core kit 1と、配列番号22-23、及び配列番号24-25に示されたプライマーペアを用いて、キットの説明書に従って作成する。PCRの終了後に3%NuSieve(FMC)で作成したア

ガロース電気泳動を行なって、増幅産物を確認した。さらに核酸の蛍光標識を増強するために、得られた増幅サンプルを再度AsymetrixPCR法で処理した。Asymetrix PCR法は、第一のPCR法からセンス鎖のプライマを削除した組成、温度サイクルから構成されている。Asymetrix PCRを行なったサンプルに10%の3M酢酸アンモニウムを加え、さらに70%濃度となるようにエタノール (Wako) を加えた。-20度で一昼夜静置し、12,000 rpm x 2minの遠心によってPCR産物を沈殿させた。沈殿を2回、70%エタノールによって沈殿を洗浄したあと、SpeedVac(Savant社)によって乾燥させた。

## 【 0 0 8 2 】

2) マイクロアレイの作製: P53とK-Ras遺伝子の検出用チップに使用したプローブの塩基配列は、GenBankなどのデータベースを参照とした。合成したプローブ (配列番号 2 6 - 5 3) を、図 6 のレイアウトとなるようにピエゾ素子を利用した微量分注システムを利用して分注した。図 6 においては、スポット A 1 - A 3 にはそれぞれ配列番号 2 6 - 2 8 のプローブを、スポット A 4 には配列番号 2 9 のネガティブプローブに蛍光標識したもの (スポット位置参照用) を、スポット B 1 - B 4 にはそれぞれ配列番号 3 0 - 3 3 のプローブを、スポット C 1 - C 3 にはそれぞれ配列番号 3 4 - 3 6 のプローブを配置し、スポット C 4 にはプローブを配置せず、スポット D 1 - D 4 にはそれぞれ配列番号 3 7 - 4 0 のプローブを、スポット E 1 - E 4 にはそれぞれ配列番号 4 1 - 4 4 のプローブを、スポット F 1 - F 4 にはそれぞれ配列番号 4 5 - 4 8 のプローブを、スポット G 1 - G 3 にはそれぞれ配列番号 4 9 - 5 1 のプローブを配置し、スポット G 4 にはプローブを配置せず、スポット H 1 及び H 4 には共に配列番号 2 9 のプローブを、そしてスポット H 2 及び H 3 にはそれぞれ配列番号 5 2 及び 5 3 のプローブを配置した。A から D の列においては、マーカ用のスポットを除き、K - r a s 用のプローブを、E から H の列においては、マーカ用のスポットを除き、P 5 3 用のプローブが配置されている。

## 【 0 0 8 3 】

3) ハイブリダイゼーション: 乾燥させたエタノール沈殿に50  $\mu$  lの純水を加えてよく溶解し、蛍光標識サンプルとした。ハイブリダイゼーションのサンプル溶

液として、3x SSPE(Sodium 磷酸緩衝液、技術資料：DNA マイクロアレイと最新 PCR 法、細胞工学別冊ゲノムサイエンスシリーズ 1 秀潤社参照)、1.0 % (V/V) ExpressHyb(Clontech 社)に 10% 溶液となるように懸濁した。ハイブリダイゼーションの分析は、オリンパス光学社製の BX-51TFR に、冷却 CCD カメラを接続した実験システムによって行なった。この実験システムは、反応フィルターの周りの溶液駆動と温度制御、および蛍光スポットの画像を自動的に行なうことが出来るように設計されている。

## 【 0 0 8 4 】

解析結果：ヒト正常人から得られたサンプルを用いて得られた実験結果の一部を示す。実験装置によって得られた DNA チップの蛍光スポットの時間変化が図 7 において示されている。図 7 の下側から、反応後 1 分、1 0 分、2 0 分、3 0 分、4 0 分の蛍光画像であり、最初に室温であった反応チャンバーが、最終的には 72 度となるように設定してある。図からも明らかなように、反応後すぐにほとんどのスポットの蛍光輝度が上昇し、さらに温度を上げるに従って、図の上部に位置する部分にスポットした P53 の 1 スポットのみが検出可能なレベルの蛍光を示すようになった。(3 0 分後) この状態では固相化されたプローブに対する K-Ras 遺伝子の  $T_m$  の値が高いために、ほとんどの K-Ras の蛍光スポット輝度の強弱は明瞭ではない。そこでさらに反応チャンバーの温度を上げるにより、K-Ras 遺伝子のスポット輝度の濃淡が明瞭に測定することが出来るようになった(4 0 分後)。一連の画像を温度条件などの情報と共にハードディスクに保存した。

## 【 0 0 8 5 】

4) 解析：得られた画像を変異検出専用プログラムした解析ソフトウェアを利用して解析した。解析ソフトウェアは、使用したマイクロアレイにスポットしたプローブの塩基配列と、実験の結果得られた画像情報を元にしてサンプルの塩基配列を自動的に決定することが出来る。3) の結果得られた画像を解析したところ、サンプルの P53 exon7 の塩基配列は、配列番号 5 4 に示される通りであることが判明した。また、K-Ras Codon12 を含む塩基配列は、配列番号 5 5 に示される通りであることが分かった。これからサンプルの塩基配列は P53, K-Ras 共に正常であることが分かった。このようにして、一つの反応アレイによって二つの遺伝子の

配列を迅速に解析することが可能であることが示された。

【 0 0 8 6 】

(実施例 5)

次に本発明の方法を遺伝子の発現解析に応用した場合について例示する。正常組織及び、病変組織のそれぞれより抽出した mRNA に対して、逆転写反応により蛍光標識を取り込み、一本鎖 cDNA を合成した。このサンプルをカイネティックなデータ取得が可能な図 1 に示される装置にマイクロアレイをセットし、それぞれの組織から発現した cDNA に対してハイブリダイズ反応を行った。画像データの取得には CCD カメラを利用した。CCD カメラには被写体の明るさに対して適切な露光時間を設定する必要があるが、サンプルの蛍光標識の程度や、蛍光物質の自体の量子効率、ハイブリダイズの反応効率等により、得られる遺伝子のハイブリダイズ像に明るさの差が生じることがある。検出を精度よく行うためにはスポットの発光像を、CCD のダイナミックレンジの中の適当な範囲内に収める必要がある。これが適当でないと暗い画像や、撮像レンジをオーバーした画像となり、精度の良い検出を行うことができない。このような未確定の撮像条件をあらかじめ設定することなくカイネティックにてデータを取得しながら、その画像を確認し、最適な撮像条件を設定しながら反応を進行させた。得られたハイブリダイズ画像はその最大輝度が、CCD のダイナミックレンジの 8 割程度となるように調整し、得られた画像を解析することで精度よくハイブリダイズ画像の検出を行うことが可能となった。

【 0 0 8 7 】

【発明の効果】

本発明の方法及び装置を用いれば、核酸についてのより多くの、より正確な、より信頼性のある情報を得ることが可能になる。

【 0 0 8 8 】

【配列表】

<110> Olympus Optical Co., Ltd.

<120> A Method of Detecting Nucleic Acid Information and Device Therefo



r

<130> 01P02548

<160> 55

<210> SEQ ID NO:1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

atcatctaga cagagatc 18

<210> SEQ ID NO:2

<211> 18

<212> DNA

<213>

<400> 2

atcatctaga gagagatc 18

<210> SEQ ID NO:3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

atcatctaga aagagatc 18

<210> SEQ ID NO:4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

atcatctaga tagagatc 18

<210> SEQ ID NO:5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gatctctgtc tagatgat 18

<210> SEQ ID NO:6

<211> 98

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

tggctctgac tgtaccacca tccactacaa ctacatatgt aacagttcct gcatgggcgg 60  
catgaaccgg aggcccatcc tcaccatcat cacactgg 98

<210> SEQ ID NO:7

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

acaactacat atgtaacagt t 21

<210> SEQ ID NO:8

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

aactgttaca catgtagttg t 21

<210> SEQ ID NO:9

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<400> 9

aactgttaca gatgtagttg t 21

<210> SEQ ID NO:10

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

aactgttaca tatgtagttg t 21

<210> SEQ ID NO:11

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<400> 11

aactgttaca aatgtagttg t 21

<210> SEQ ID NO:12

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

gactgaatat aaacttgttg 20

<210> SEQ ID NO:13

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

ctattgttgg atcatattcg 20

<210> SEQ ID NO:14

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<400> 14

cctacgccac cagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:15

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

gttggagctg ttggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:16

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gttggagctg atggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:17

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

gttggagctg ctggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:18

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gttggagcta gtggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:19

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

gttggagctt gtggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:20

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

gttggagctc gtggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:21

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

gttggagctg gtggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:22

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

tggctctgac tgtaccacca 20

<210> SEQ ID NO:23

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

ccagtgtgat gatggtgagg 20

<210> SEQ ID NO:24

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

gactgaatat aaacttgtgg 20

<210> SEQ ID NO:25

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

ctattgttgg atcatattcg 20

<210> SEQ ID NO:26

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

cctacgccag cagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:27

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

cctacgccat cagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:28

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

cctacgccaa cagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:29

<211> 22



<212> DNA

<213> artificial

<400> 29

catgtatcga ggataaatga ag 22

<210> SEQ ID NO:30

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

cctacgccac cagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:31

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

cctacgccac gagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:32

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

cctacgccac aagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:33

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

cctacgccac tagctccaac 20

<210> SEQ ID NO:34

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

gttggagctg ctggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:35

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

gttggagctg atggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:36

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

gttggagctg ttggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:37

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

gttggagctg gtggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:38

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

gttggagctc gtggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:39

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

gttggagctt gtggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:40

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

gttggagcta gtggcgtagg 20

<210> SEQ ID NO:41

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

aactgttaca catgtagttg t 21

<210> SEQ ID NO:42

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

aactgttaca gatgtagttg t 21

<210> SEQ ID NO:43

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

aactgttaca tatgtagttg t 21

<210> SEQ ID NO:44

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

aactgttaca aatgtagttg t 21

<210> SEQ ID NO:45

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

acaactacat gtgtaacagt t 21

<210> SEQ ID NO:46

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 46

acaactacat ctgtaacagt t 21

<210> SEQ ID NO:47

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

acaactacat atgtaacagt t 21

<210> SEQ ID NO:48

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

acaactacat ttgtaacagt t 21

<210> SEQ ID NO:49

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

acaactacag atgtaacagt t 21

<210> SEQ ID NO:50

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

acaactacat atgtagcagt t 21

<210> SEQ ID NO:51

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

acaagtacat atgtaacagt t 21

<210> SEQ ID NO:52

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

acaagtacat atgtagcagt t 21

<210> SEQ ID NO:53

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

acaagtacag acgtagcagt t 21

<210> SEQ ID NO:54

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

acaactacat gtgtaacagt t 21

<210> SEQ ID NO:55

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

ggtggagctg gtggcgtagg 20

# 【図面の簡単な説明】

【図 1】 この図は、本発明の核酸情報解析装置の概略を示す図である。

【図 2】 この図は、標的核酸と、完全マッチプローブまたは不完全マッチプローブとのハイブリダイズを、ハイブリダイズ温度を変化させながらカイネティックに測定した結果を示す図である。図中の（A）の領域ではシグナルの測定温度を 25℃に、（B）の領域では 40℃に、そして（C）の領域では 60℃にした。各温度においては、試料溶液を核酸反応担体へ各 5 回往復させた。

【図 3】 この図は、細胞株由来の p 5 3 遺伝子を、本発明の方法により検出した結果を示す図である。

【図 4】 この図は、実施例 3 において使用した DNA マイクロアレイのプローブ配置図である。

【図 5】 この図は、K-R A S 遺伝子の変異を検出する、実施例 3 の実験結果を示す図である。図中、下のパネルからそれぞれ、ハイブリダイズ開始後、1 分、1 0 分、2 0 分、3 0 分、及び 4 0 分の時の蛍光を測定した結果が示されている。

【図 6】 この図は、実施例 4 において使用した DNA  $\mu$  アレイのプローブ配置図である。

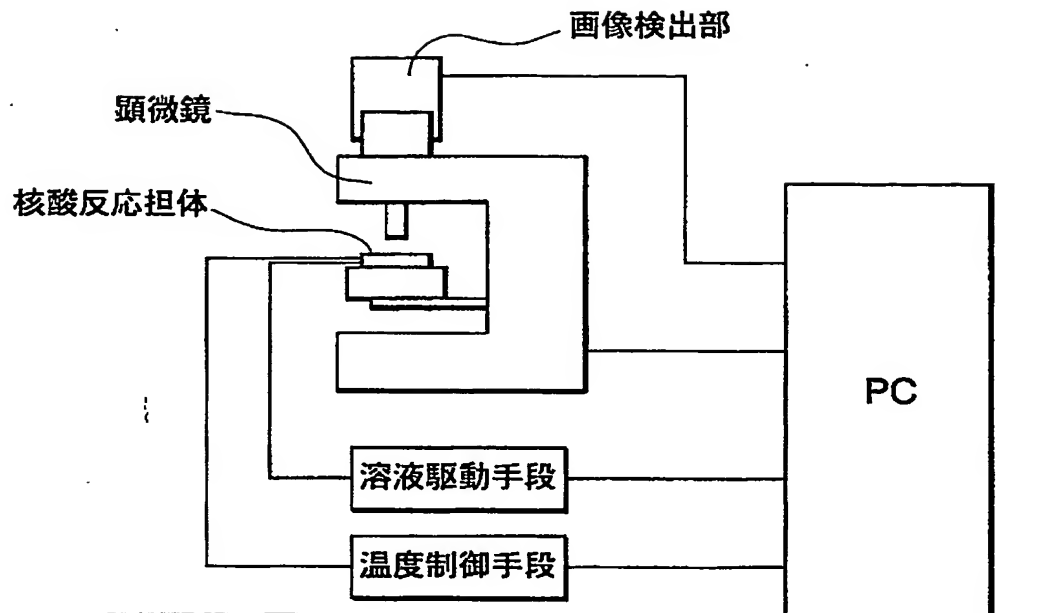
【図 7】 p 5 3 遺伝子及び K-R A S 遺伝子を同時に検出する実施例 4 の



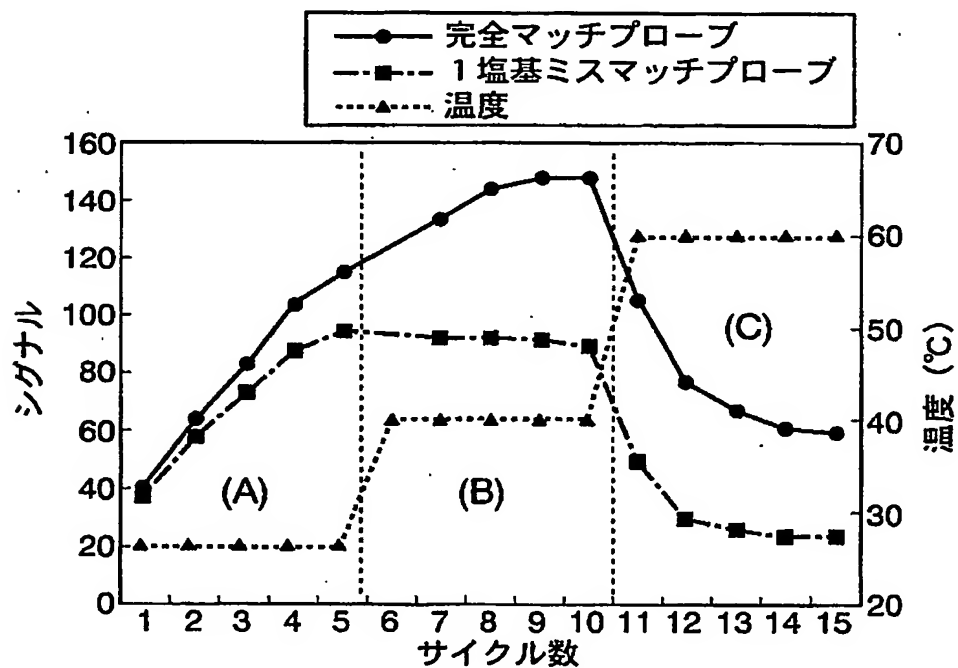
実験結果を示す図である。図中、下のパネルからそれぞれ、ハイブリダイズ開始後、1分、10分、20分、30分、及び40分の時の蛍光を測定した結果が示されている。

【書類名】 図面

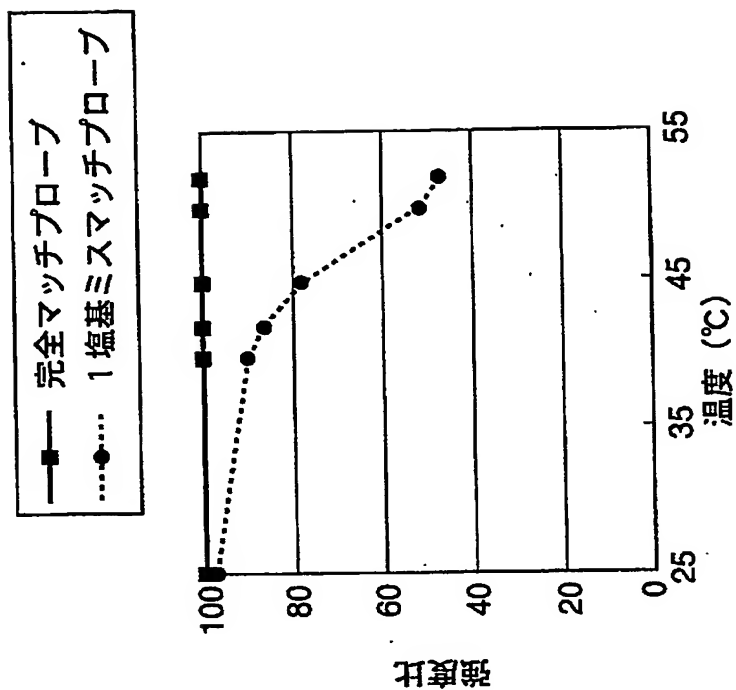
【図1】



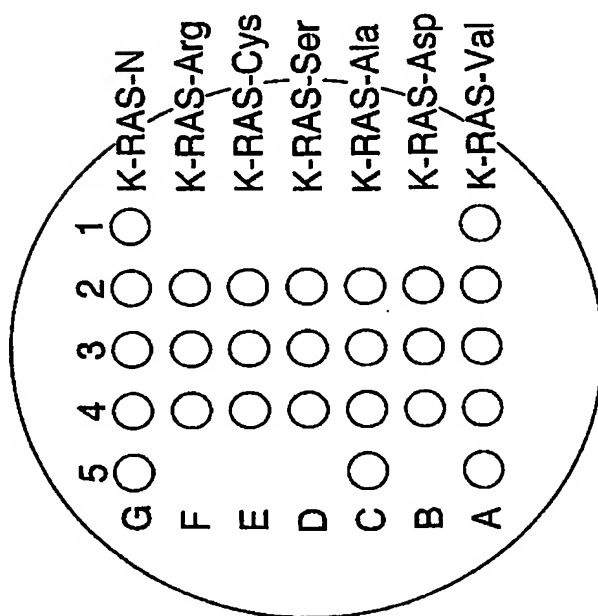
【図2】



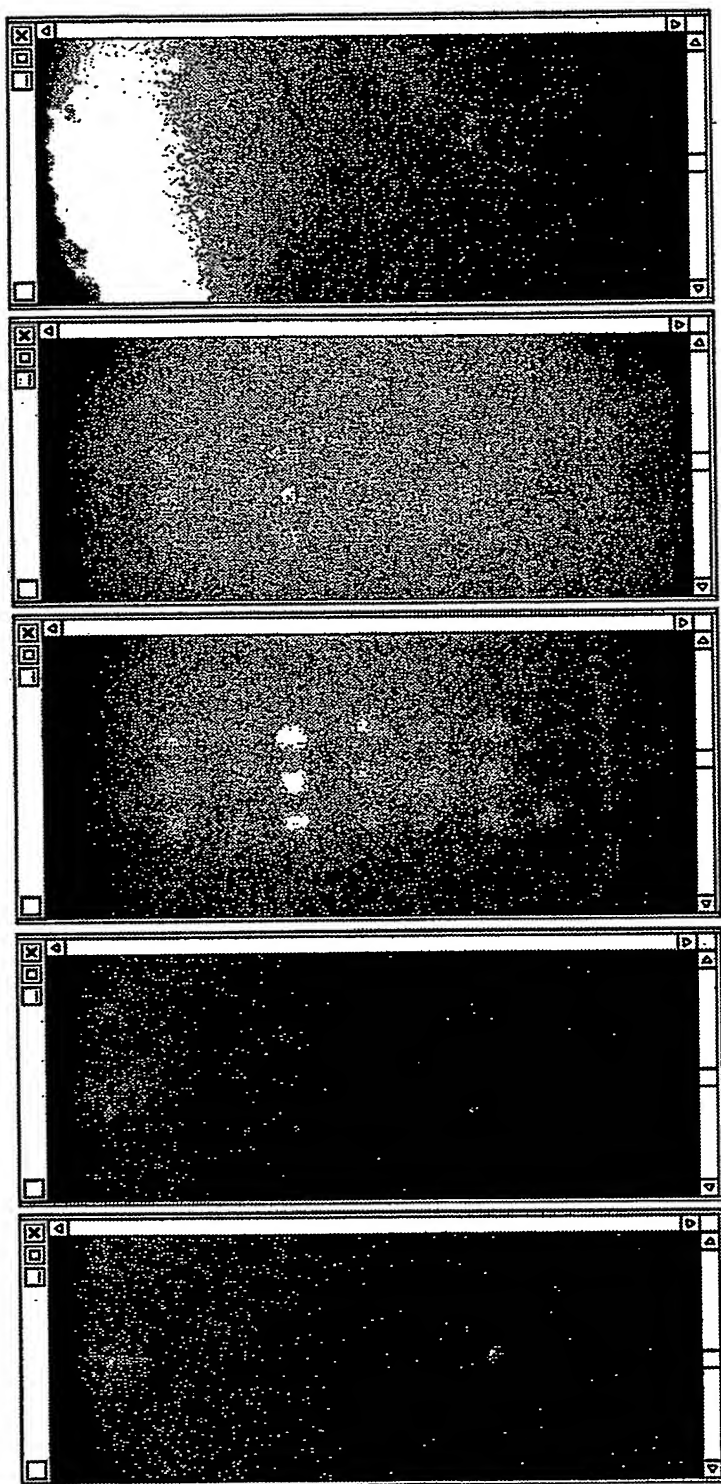
【図 3】



【図 4】

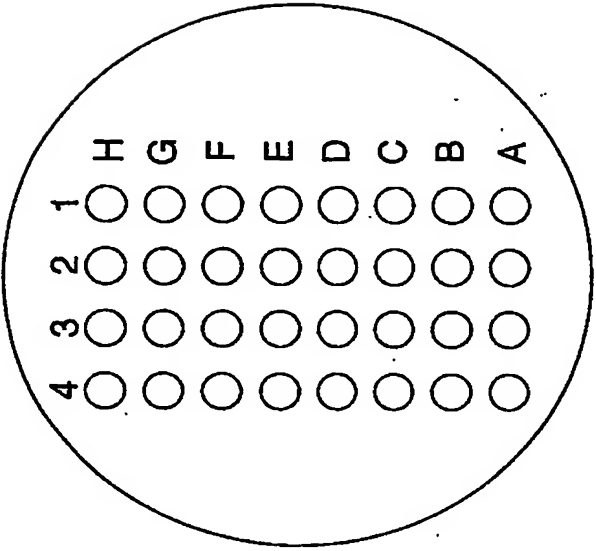


【図5】

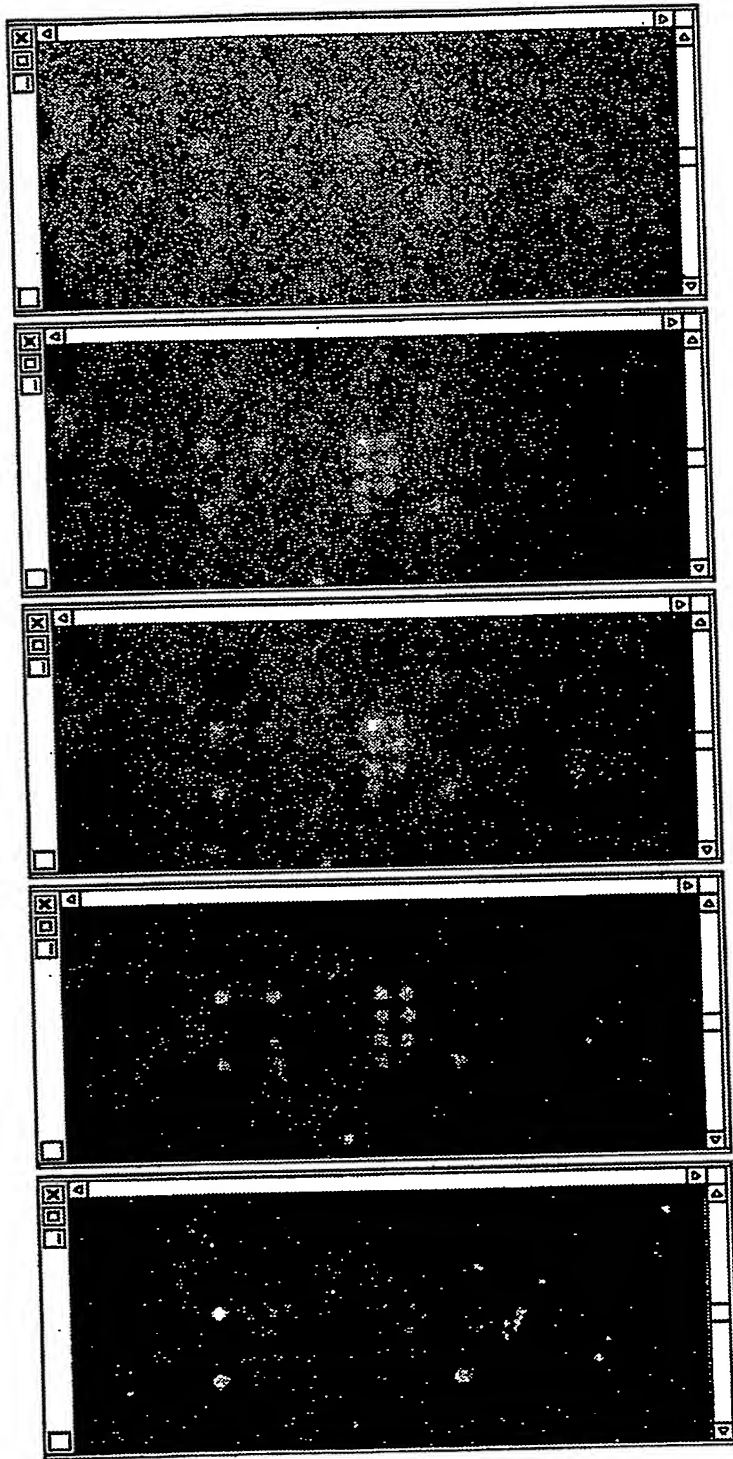


BEST AVAILABLE COPY

【図6】



【図7】



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 短時間で精度良く、核酸情報を検出する方法を提供すること。

【解決手段】 標的核酸と、当該標的核酸配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するプローブとを接触させ、当該標的核酸と当該プローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの量に依存した量で発せられるシグナルを測定することにより、当該標的核酸の情報を検出する方法において、当該シグナルのデータ取得をカイネティックに行うことを含み、好ましくは、シグナルのデータ取得が、反応温度、又は反応溶液の組成、容量、若しくは種類の売りの少なくとも1つを変更しながら行われることを特徴とする方法。

【選択図】 図2

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-017272
受付番号	50200099465
書類名	特許願
担当官	森吉 美智枝 7577
作成日	平成14年 2月 4日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000000376

【住所又は居所】

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

【氏名又は名称】

オリンパス光学工業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100106909

【住所又は居所】

東京都新宿区高田馬場3-23-3 ORビル

【氏名又は名称】

棚井 澄雄

【代理人】

【識別番号】

100064908

【住所又は居所】

東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビル 志賀国際特許事務所

【氏名又は名称】

志賀 正武

【選任した代理人】

【識別番号】

100101465

【住所又は居所】

東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビル 志賀国際特許事務所

【氏名又は名称】

青山 正和

【選任した代理人】

【識別番号】

100094400

【住所又は居所】

東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビル 志賀国際特許事務所

【氏名又は名称】

鈴木 三義

【選任した代理人】

【識別番号】

100086379

【住所又は居所】

東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビル 志賀国際特許事務所

【氏名又は名称】

高柴 忠夫

次頁有



認定・付加情報（続き）

【選任した代理人】

【識別番号】

100118913

【住所又は居所】

東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビ  
ル志賀国際特許事務所

【氏名又は名称】

上田 邦生

特2002-017272

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000376]

1. 変更年月日	1990年 8月20日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号
氏 名	オリンパス光学工業株式会社